

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in patients with occlusive arterial diseases in consideration with risk factors and conservative treatment of the disease

Inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI) u chorych na zarostowe choroby naczyń tętniczych z uwzględnieniem czynników ryzyka i leczenia zachowawczego

Piotr Radziwon^{1,2}, Michał Bielawiec², Janusz Kłoczko², Jan Giedrojć², Katarzyna Mazgajska², Marzenna Galar², Marzenna Klimiuk²

¹Regional Centre for Transfusion Medicine in Białystok, ²Department of Haematology, Medical Academy in Białystok, Poland (¹Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku, ²Klinika Hematologii AM w Białymstoku)

This study was supported by grant No. 4P05B 06I 10 from State Committee for Scientific Research. Badanie częściowo sfinansowano ze środków Komitetu Badań Naukowych (grant nr 4P05B 06I 10)

Abstract

The aim of the study was to determine the level of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in patients with arterial occlusive diseases of the lower limbs and to consider correlation of TFPI with some risk factors of the development of these diseases: cigarette smoking, hyperlipidaemia and age. The effect of conservative treatment with pentoxifylline and alprostadil of the peripheral arterial occlusive disease (PAOD) on plasma concentration of TFPI was also investigated. TFPI concentration was not dependent on the age of healthy persons. Patients with PAOD or Buerger's disease showed elevated concentrations of TFPI compared to healthy adults without any symptoms of the arterial disease, 333.3 ± 100.2 ng/mL, 177.9 ± 67.1 ng/mL, 95.7 ± 25.3 ng/mL respectively. There are no significant differences of TFPI concentration in smokers, former smokers and non-smokers in the group of healthy persons. Conservative treatment of PAOD with pentoxifylline or alprostadil had no effect on TFPI concentration in patients with PAOD. The results of the study suggest, that the elevated TFPI concentration in patients with arterial occlusive diseases mainly depends on state of the vascular endothelium.

Key words: TF, TFPI, atherosclerosis, Buerger's disease

Streszczenie

Celem badań była ocena stężenia TFPI u chorych na zarostowe choroby tętnic kończyn dolnych oraz zbadanie korelacji stężenia TFPI z wybranymi czynnikami ryzyka rozwoju tych chorób: paleniem tytoniu, hiperlipidemią, a także z wiekiem. Dodatkowo oceniano wpływ leczenia zachowawczego u chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych na stężenie TFPI. Stężenie czynnika tkankowego i jego inhibitora nie różniło się wśród osób zdrowych z poszczególnych grup wiekowych, bez klinicznych objawów chorób naczyń. U chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych oraz u chorych na chorobę Buergera wykazano istotnie wyższe stężenie TFPI niż u osób zdrowych — odpowiednio $333,3 \pm 100,2$ ng/ml, $177,9 \pm 67,1$ ng/ml, $95,7 \pm 25,3$ ng/ml. Nie stwierdzono istotnych różnic średniego stężenia TFPI w grupach zdrowych osób: niepalących tytoniu, aktualnie palących tytoni czy palących tytoni w przeszłości. Leczenie zachowawcze

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr Piotr Radziwon, Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, ul. Skłodowskiej 23, 15–950 Białystok, Poland
tel.: +48 (0 85) 744 70 02, faks: +48 (0 85) 744 71 33, e-mail: pmrsmok@amb.ac.bialystok.pl

alprostadylem i pentoksyfiling nie wpłynęło istotnie na stężenie TFPI u chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych. Wyniki badań sugerują, że podwyższone stężenie TFPI u chorych na zarostowe choroby tętnic zależy głównie od stanu śródbłonna naczyniowego.

Słowa kluczowe: TF, TFPI, miażdżycza, choroba Buergera

Introduction

Occlusive vascular disease most often results from thrombosis. The infiltration of the arterial wall by lipid components and the lesion of endothelium contribute to the decrease of vascular lumen. The lesion of the endothelial cells or disruption of plaque exposes thrombogenic material and leads to the activation of the coagulation cascade and results in the production of the mural thrombus narrowing or closing the blood vessel [1]. Thrombin can also regulate smooth muscle proliferation or cytokine release, which may contribute to the evolution of atherosclerotic lesions. Apart from this "coagulation" theory of atherosclerosis, the "lipid" theory found also approval. In the light of this theory formation of atherosclerotic plaque is initiated by lipoproteins, which induce changes in the intima involving migration of macrophages, formation of foam cells, and migration and proliferation of smooth muscle cells.

The critical point of both theories of the pathogenesis of atherosclerosis is early functional lesion of endothelium. The endothelium plays an important role in regulating vascular homeostasis. Endothelial dysfunction caused by aging, menopause and hypercholesterolaemia is involved in the development of atherosclerotic vascular lesions, and predisposes the blood vessel to several vascular disorders, such as vasospasm and thrombosis. Multiple mechanisms are apparently involved in the pathogenesis of the endothelial dysfunction in atherosclerosis [2]. Thus, the endothelium is a novel therapeutic target for the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease.

Studies of the last years indicate the dominating role of tissue factor dependent extrinsic coagulation cascade in the haemostasis disorders and in the thrombo-embolic complications, seen in the occlusive diseases of blood vessels [2].

Tissue factor (TF), a cell surface glycoprotein, serves as cellular receptor for either activated or non-activated factor VII. TF complexed with the serine protease, factor VIIa, is the primary initiator of blood coagulation by way of activation of the zymogen factor X. Once tissue factor-factor VIIa (TF/VIIa) complex is assembled on cell surfaces the strongest natural plasma inhibitor, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) plays an impor-

Wstęp

Główną przyczyną powikłań zakrzepowo-zatorowych wywołujących zawał serca, zator tętnic mózgu czy zmiany martwicze kończyn jest proces miażdżycowy doprowadzający w efekcie do zwężenia światła naczynia na skutek nacieczenia ściany tętnic, głównie składnikami lipidowymi i uszkodzenie śródbłonna pokrywającego warstwę wewnętrzną ściany naczyniowej. Przerwanie ciągłości błony wewnętrznej z uszkodzeniem czynnościowym komórek śródbłonna powoduje uruchomienie procesu krzepnięcia w miejscu uszkodzenia, doprowadzające do powstania przyściennego zakrzepu zwężającego bądź zamykającego światło naczynia i upośledzenia przepływu krwi [1]. Oprócz tzw. krzepnięciowej teorii powstawania miażdżycy przyjmuje się również teorię lipidową, w której za punkt wyjścia zmian chorobowych uznaje się stymulujący wpływ lipoprotein na powstawanie i rozrost zmian miażdżycowych w ścianie naczynia.

Niezależnie od powyższych teorii punktem krytycznym w patogenezie zarostowych chorób tętnic, będących źródłem powikłań zakrzepowo-zatorowych, jest śródbłonek naczyń, szczególnie jego stan czynnościowy [2]. Dobrze poznany i niekwestionowany jest jego udział w modulowaniu układu fibrynolitycznego przez tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA, *tissue plasminogen activator*) czy inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI, *plasminogen activator inhibitor*), jak również uczestniczenie w syntezie prostanoidów oddziaływujących na hemostazę naczyniową i płytkową.

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na rolę zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia w zaburzeniach hemostazy i powikłaniach zakrzepowo-zatorowych występujących w zarostowych chorobach naczyń krwionośnych [2].

Aktywacja zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia rozpoczyna się od generacji czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*), który jest integralną glikoproteiną błony komórkowej, mającą silne powinowactwo receptorowe i spełniającą funkcję kofaktora czynnika VII. Czynniki tkankowy jest białkiem błonowym eksponowanym w komórkach głównie w miejscach fizycznie oddzielonych od krążącej krwi, odgrywającym kluczową rolę ochronną przed krwawieniem na skutek uszkodzenia tkanek. Znajduje się on w przydanie naczyń krwionośnych, w tkance włóknistej otaczającej wątrobę, śledzionę

tant role in regulating the TF/VIIa functional activity. Tissue factor pathway inhibitor has a double, two step inhibitory effect. It inhibits the active factor X and in a complex with this factor TFPI binds to the TF/VIIa complex inhibiting its enzymatic activity or inhibiting the activation of factor VII bound to TF [3, 4]. TFPI may also inhibit TF/VIIa complex without presence of factor Xa, however 50 fold higher concentration of TFPI is needed in order to achieve the similar inhibitory effect [5].

TFPI is a calcium dependent inhibitor of the extrinsic clotting system. TFPI forms with an active factor X (Xa) the complex, which inhibits the catalytic activity of tissue factor/factor VII complex. The molecule of TFPI possesses three tandem Kunitz-type domains [6]. The first domain is responsible for binding to TF, the second domain binds to Xa and the third one is probably involved in complexing with lipoproteins.

Apart from the endothelium, megakaryocytes and hepatoma cells have the ability to TFPI synthesize [7, 8]. The most of TFPI remains in a close contact with endothelial cells, the main site of its synthesis. In plasma about 50% of TFPI are bound to VLDL and LDL, about 45% to HDL and 5–10% are probably in a free form [9]. Approximately 8% of circulating TFPI is complexed with platelets.

Heparins and also other glycosaminoglycans such as dermatan sulfate or aprosulate induce release or redistribution of TFPI leading to the increase of its plasma concentration [10]. TFPI release is a very important mechanism of action of GAGs *in vivo*. When coagulation is activated by small amounts of tissue factor TFPI is a more important inhibitor of clotting than AT III. TFPI applied to animals effectively inhibited thromboplastin-induced intravascular coagulation and development of bacterial sepsis induced by the lethal infusion of *Escherichia coli*, prevented reocclusion of the femoral artery after t-PA lysis of platelet rich thrombi and blocked formation of induced thrombosis [11–13]. While the anticoagulant potency of TFPI and its very close relationship with lipoproteins (about 90% of circulating TFPI is bound to LDL and HDL) is well recognized, the further elucidation of the role of TFPI in pathogenesis of atherosclerosis has to be performed.

The aim of the study was to determine the level of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in patients with arterial occlusive diseases of the lower limbs and to consider correlation of TFPI with some risk factors of the development of atherosclerosis: cigarette smoking, hyperlipidaemia and age. The effect of conservative treatment with pentoxifylline and alprostadil of the peripheral arterial occlusive disease (PAOD) on plasma concentration of TFPI was also investigated.

czy nerki. Ten otoczkowy wzór ekspresji TF oznacza, że tylko uszkodzenie naczynia może aktywować krzepnięcie. Zgodnie z tą hipotezą w prawidłowych warunkach komórki krwi, jak i śródbłonna nie uwalniają czynnika tkankowego. Chociaż TF może być uwalniany w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych i krążącej w nich krwi, to jednak miejsce jego uwalniania jest fizycznie oddzielone od krążącej krwi. Uszkodzenie śródbłonna (bariery oddzielającej czynniki tkankowe od krążącej krwi) umożliwia połączenie się kofaktora (TF) z czynnikiem VII w wystarczającej ilości do aktywacji krzepnięcia i powstania zakrzepu [3, 4].

Śródbłonek naczyń krwionośnych produkuje najsilniejszy naturalny inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*), który jest białkiem typu Kunitza o masie cząsteczkowej 42 kD z trzema inhibitorowymi domenami [6]. Pierwsza z nich łączy się z kompleksem TF z czynnikiem VII, w drugiej wiąże się aktywny czynnik Xa, a trzecia odpowiada za wiązanie się TFPI z heparyną i lipoproteinami.

Oprócz śródbłonna mogą go również produkować megakariocyty i komórki hepatoma [7, 8]. Stężenie i aktywność TFPI mierzona u zdrowych osób waha się w dość szerokich granicach: 50–170 ng/ml. Większość TFPI wiąże się z głównym miejscem jego syntezy — śródbłonkiem. Około 90% krążącego TFPI pozostaje w ścisłym związku z lipoproteinami, głównie z cholesterolem frakcji LDL, a w nieco mniejszym stopniu z cholesterolem frakcji HDL. Około 5% osocznego TFPI pozostaje w wolnej postaci [9]. Płytki krwi zawierają do 8% krążącego TFPI.

Inhibitor ten wykazuje dwustopniowe działanie hamujące kaskadę krzepnięcia. W pierwszej fazie inhibitor ten łączy się z aktywnym czynnikiem X, a następnie w kompleksie z nim wiąże kompleks czynnika tkankowego z aktywnym czynnikiem VII, blokując jego aktywność enzymatyczną [3, 4]. Może on również hamować kompleks TF/VIIa podczas nieobecności aktywnego czynnika X, jednakże wymaga to 50-krotnie wyższego stężenia TFPI niż w przypadku obecności tego czynnika [5].

Pełnołańcuchowy TFPI *in vitro* silnie hamuje czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*), czas protrombinowy (PT, *prothrombin time*), Heptest i generację trombinę. Podawany zwierzętom skutecznie blokuje krzepnięcie indukowane tromboplastyną i rozwój posocznicy wywołanej letalną infuzją bakterii *Escherichia coli* [11, 12]. Inhibitor ten zapobiega też tworzeniu się zakrzepów oraz reokluzji tętnicy udowej po skutecznej lizie t-PA bogatych w płytki krwi zakrzepów [13].

Uwalnianie TFPI jest bardzo ważnym mechanizmem działania glikozaminoglikanów *in vivo* [10]. Heparyny, siarczan dermatanu, siarczan heparanu, pochodne kwasu

Material and methods

Subjects

1. Healthy volunteers ($n = 100$) divided into 4 groups: 20–30 years old, 30–40 years old, 40–50 years old, and 50–60 years old; 25 persons each, without clinical symptoms of vascular disease and normal plasma lipid concentrations.

2. 26 cigarette smokers (mean consumption 20 cigarettes/day, 14 former smokers, who have stopped smoking at least 6 months before presented study, and 13 healthy non-smokers.

3. 53 patients suffering from PAOD and 32 patients suffering from Buerger's disease. The diagnosis was made on the basis of clinical symptoms confirmed by ultrasound, rheographic and transcutaneous oxygen pressure measurements.

Blood collection and preparation of platelet poor plasma

Whole blood was taken from cubital vein and anticoagulated with sodium citrate (final concentration 0.32%). Platelet poor plasma (PPP) was obtained by the centrifugation of whole blood at $2000 \times g$ for 10 min. To determine the effect of conservative treatment of PAOD on TF and TFPI concentrations samples were taken before and 15 min after infusion of medication.

Medication

1. Pentoxifylline (Trental, Hoechst, Germany) in a single intravenous dose of 300 mg administered over 180 min.

2. Alprostadil (Prostvasin, Schwarz Pharma, Germany) in a single intravenous dose of 0.04 mg administered over 120 min.

Laboratory tests

1. Tissue Factor Pathway Inhibitor concentration

Tissue factor pathway inhibitor antigen concentration was determined using an Imubind Total TFPI ELISA assay (American Diagnostica, USA). Both full-chain as well as "truncated" TFPI, complexed with either TF or factor VIIa are detected in the test. Imubind Total TFPI ELISA assay has slightly lower sensitivity against TFPI complexed with TF/VIIa/Xa (TF/VIIa/TFPI/Xa). Diluted plasma (1:40) was incubated in test wells precoated with the capture antibody. A biotinylated second antibody was then added to detect the captured TF or TFPI. After addition of a streptavidin-conjugated horseradish peroxidase the antibody enzyme detection complex was formed. TF or TFPI antigen concentration was determined following the addition of a chromogenic substrate

laktobionowego indukują uwalnianie lub redystrybucję TFPI prowadzącą do wzrostu jego stężenia w osoczu. Pentasachryd i hirudyna nie wpływają na stężenie TFPI.

Biorąc pod uwagę bardzo ścisły związek TFPI z lipoproteinami (ponad 90% krążącego inhibitora wiąże się z LDL i HDL), może on być ogniwem łączącym lipidową i krzepnięciową teorię powstawania zmian miażdżycowych.

Głównym celem planowanych badań była ocena stężenia TFPI u chorych na zarostowe choroby tętnic oraz zbadanie korelacji stężenia TFPI z wybranymi czynnikami ryzyka rozwoju tych chorób: paleniem tytoniu, hiperlipidemią, a także z wiekiem. Dodatkowo oceniano wpływ leczenia zachowawczego u chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych (PAOD, *peripheral arterial occlusive disease*) na stężenie TFPI.

Material i metody

Grupa badanych

Do badania włączono:

1) 100 zdrowych osób z różnych przedziałów wiekowych (po 25 osób w każdym przedziale obejmującym 10 lat) bez klinicznych objawów chorób naczyń, z prawidłowymi parametrami gospodarki lipidowej.

2) 26 osób palących regularnie tytoń (średnio 20 papierosów/dz.), 14 osób, które paliły tytoń w przeszłości, a w momencie włączenia do badania nie paliły od 0,5–5 lat, oraz 13 osób zdrowych nigdy niepalących tytoniu.

3) 53 chorych z PAOD oraz 32 osoby z chorobą Buergera. Rozpoznanie choroby ustalano na podstawie badań klinicznych potwierdzonych badaniem dopplerowskim, reograficznym oraz przezskórnym pomiarem ciśnienia parcjalnego tlenu.

Pobieranie materiału do badań

Krew do badań pobierano rano, na czczo, z żyły łokciowej do 3,2-procentowego roztworu cytrynianu sodu w stosunku 9:1. Osocze otrzymywano przez wrowanie krwi przy $2000 \times g$ przez 10 min. Próbkę do momentu przeprowadzania oznaczeń przechowywano w temperaturze -20°C . Bezpośrednio po pobraniu wykonywano morfologię krwi oraz mierzono stężenie PT, fibrynogenu i APTT.

Do oceny wpływu leczenia zachowawczego na stężenie TF i TFPI krew pobierano przed podaniem leku i 15 min po zakończeniu wlewu.

Leczenie zachowawcze

1. Podawanie pentoksyfiliny (Trental, Hoechst, Niemcy) w dawce 300 mg, jednorazowo w dożylnym wlewie w ciągu 180 min.

by reading the absorbance at 450 nm. The absorbance of each sample was then compared with a standard curve.

2. Tissue Factor concentration

Tissue Factor antigen concentration was determined using an Imubind TF ELISA (American Diagnostica, USA). The test procedure was similar to that described above.

3. Tissue Factor Pathway Inhibitor activity

The measurements were done using a chromogenic assay (Actichrome TFPI, American Diagnostica, USA). In this assay TFPI inhibitory activity of catalytic activation of factor X induced by VIIa/TF complex has been measured. After incubation with plasma sample the remaining activity of VIIa/TF complex is measured using highly specific for factor Xa chromogenic substrate (spectrozyme fXa).

4. Prothrombin fragment F1 + 2

Prothrombin fragment F1 + 2 concentration was measured using immunoenzymatic method F1 + 2, Behring, Germany.

5. Activated partial thromboplastin time

The APTT measurements were performed using coagulometer Fibrintimer (Labor, Germany). 100 μ l PPP were incubated with 100 μ l Neothromtin (Behring, Germany) for 60 s at 37°C. After incubation 100 μ l CaCl₂ (25 mmol/L) were added and coagulation time has been measured.

6. Prothrombin time

The PT measurements were performed using coagulometer Fibrintimer (Labor, Germany). 100 μ l PPP were incubated for 60 s at 37°C. After incubation 200 μ l Thromborel S (Behring, Germany) were added and coagulation time has been measured.

7. Fibrinogen

Fibrinogen concentration was measured using coagulometer Fibrintimer (Labor, Germany) according to the method of Claus [14]. 100 μ l PPP were incubated for 60 s at 37°C. After incubation 200 μ l of reagent (Multifibren U and Kaolinsuspension, 1:1 v/v, Behring, Germany) were added and coagulation time has been measured. In this method coagulation time correlates with fibrinogen concentration. The results were calculated according to the standard table enclosed to the Multifibren by the manufacturer.

Serum lipid measurements

8. Total cholesterol

Concentration of cholesterol was measured using enzymatic method (Ciba Corning Cholesterol Reagent, Sweden). Mean concentration of HDL-cholesterol in healthy persons is 146 mg/dl.

9. HDL-cholesterol

HDL-cholesterol concentration was measured according to the method of Finley in modification of War-

2. Podawanie alprostadylu (Prostvasin, Schwarz Pharma, Niemcy) w dawce 0,04 mg, jednorazowo w dożylnym wlewie w ciągu 120 min.

Badania laboratoryjne

1. Pomiar stężenia całkowitego TFPI

Stężenie TFPI oznaczano za pomocą immunoenzymatycznego testu IMUBIND Total TFPI ELISA Kit (American Diagnostica Inc., Stany Zjednoczone). W teście oznaczane są zarówno TFPI pełnołańcuchowy, jak i formy „truncated TFPI”, pozostające w połączeniu z TF lub z czynnikiem VIIa. Słabiej rozpoznawany jest TFPI w połączeniu z czynnikiem Xa (TFPI/Xa) oraz kompleks TFPI z czynnikiem tkankowym, Xa i VIIa (TF/VIIa/TFPI/Xa). Test IMUBIND Total TFPI ELISA jest kanapkowym testem wykorzystującym królicze poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu TFPI.

2. Pomiar stężenia czynnika tkankowego

Czynnik tkankowy (TF) oznaczano przy użyciu immunoenzymatycznego zestawu IMUBIND TF ELISA Kit (American Diagnostica Inc., Stany Zjednoczone), wykorzystującego ludzkie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko TF. Przeciwciała te rozpoznają i neutralizują ludzką, mózgową tromboplastynę. Zestaw wykrywa TF oraz kompleks VII/TF.

3. Pomiar aktywności TFPI

Aktywność TFPI oznaczano za pomocą zestawu ACTICHROME TFPI Activity Assay (American Diagnostica Inc., Stany Zjednoczone). Zestaw mierzy zdolność TFPI do hamowania katalitycznej aktywacji czynnika X przez kompleks VIIa/TF. Po inkubacji badanych prób z kompleksem VIIa/TF i czynnikiem X pozostała aktywność kompleksu VIIa/TF jest oznaczana przy użyciu SPECTROZYME fXa, wysoce specyficznego dla czynnika Xa substratu chromogennego uwalniającego p-nitroanilinę (pNA).

4. Fragmenty protrombiny F1 + 2

Fragmenty protrombiny F1 + 2 określano za pomocą immunoenzymatycznego testu Enzygnost F1 + 2 (Behring, Niemcy).

5. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

Oznaczenia wykonywano przy użyciu koagulometru Fibrintimer (Labor, Niemcy). Osocze (100 μ l) inkubowano z 100 μ l Neothromtin (Behring, Niemcy) przez 120 s w temp. 37°C, a następnie indukowano krzepnięcie krwi, dodając 100 μ l roztworu CaCl₂ (25 mmol/l).

6. Czas protrombinowy

Oznaczenia wykonywano przy użyciu koagulometru Fibrintimer (Labor, Niemcy). Osocze (100 μ l) inkubowano przez 60 s w temp. 37°C, a następnie indukowano krzepnięcie krwi, dodając 200 μ l Thromborel S (Behring, Niemcy). Czas [s] od momentu dodania CaCl₂ do wystąpienia skrzepu rejestrowanego fotodetekтором mierzono automatycznie.

nick using Ciba Corning HDL-Cholesterol Precipitant (Sweden) [15, 16]. Mean concentration of HDL-cholesterol in healthy persons is 39 mg/dl [15, 16].

10. Triglicerydes

Concentration of triglicerydes was measured according to the enzymatic method of Nagele, using commercial kit (Triglicerydes GPO, Ciba Corning, Sweden). Mean concentration of triglicerydes in healthy persons is 124 mg/dl.

Statistics

The data are presented as mean values \pm standard deviation (SD). For statistical evaluation of the results Wilcoxon's test and t-test were used.

Results

1. The mean total TFPI and TF concentrations in healthy subjects without any symptoms of the arterial disease

The mean concentration of TF was 226.32 ± 86.19 pg/mL, the mean total concentration of TFPI was 89.42 ± 25.09 ng/mL and the mean TFPI activity was 87.41 ± 9.87 ng/mL. There was no correlation between TF and either with total TFPI concentration or TFPI activity in 60 healthy volunteers. We did not observe any age-associated trends of TFPI concentration in healthy persons (Table I). Mean APTT, PT, fibrinogen concentration, prothrombin fragment F1 + 2 concentration were similar in all investigated age groups of healthy persons. There were also no significant differences in total cholesterol, HDL, LDL, triglicerydes concentrations between investigated groups (Table I). TFPI concentration did not correlate with total cholesterol, HDL, LDL, triglicerydes concentrations in healthy persons.

2. The effect of cigarette smoking on TFPI concentration and activity in healthy persons

The TFPI concentration and activity were compared in healthy volunteers who were smokers ($n = 26$), non-

7. Stężenie fibrynogenu

Oznaczenia wykonywano przy użyciu koagulometru Fibrintimer (Labor, Niemcy). Zastosowano modyfikację metody Clausa [14]. Osocze (100 μ l) inkubowano przez 1 min w temp. 37°C, a następnie dodawano 200 μ l odczynnika złożonego z równych części Multifibrenu U (Behring, Niemcy) i roztworu kaolinu (Kaolinsuspension, Behring, Niemcy). W tej metodzie czas krzepnięcia jest proporcjonalny do stężenia fibrynogenu, które odczytuje się na podstawie załączonej do odczynnika tabeli przeliczeniowej.

Badania parametrów gospodarki lipidowej

8. Cholesterol całkowity

Stężenie cholesterolu mierzono przy użyciu testu enzymatycznego Ciba Corning Cholesterol Reagent (Szwecja). Średnie stężenie cholesterolu u osób zdrowych wynosi 146 mg/dl.

9. Cholesterol frakcji HDL

Stężenie cholesterolu frakcji HDL oznaczano za pomocą zestawu CIBA CORNING HDL-Cholesterol Precipitant (Szwecja). Test ten oparty jest na metodzie Finleya udoskonalonej późniejszymi badaniami Warnicka. Średnie stężenie cholesterolu frakcji HDL u osób zdrowych wynosi 39 mg/dl [15, 16].

10. Triacyloglicerole

Stężenie triacylogliceroli oznaczano za pomocą opartego na metodzie Nagele testu enzymatycznego firmy CIBA CORNING Triglicerydes GPO (Szwecja). Średnie stężenie triacylogliceroli u osób zdrowych wynosi 124 mg/dl.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna otrzymanych wyników obejmowała obliczenia: średniej statystycznej, odchylenia standardowego (SD, *standard deviation*), współczynnika korelacji. Istotność statystyczną oceniano testem t-Studenta oraz testem Wilcoxon.

Wyniki

1. Określenie średniego stężenia TF i TFPI u osób zdrowych bez klinicznych objawów chorób naczyń krwionośnych w zależności od wieku

Średnie stężenie TF w całej badanej grupie osób zdrowych wynosiło $226,32 \pm 86,19$ pg/ml, średnie stężenie TFPI: $89,42 \pm 25,09$ ng/ml, a średnia aktywność TFPI: $87,41 \pm 9,87$ ng/ml. Wykonane badania nie wykazały korelacji stężenia TFPI ze stężeniem TF. Nie stwierdzono też istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem TF i TFPI wśród osób z różnych grup wiekowych. Średnie stężenia TF i TFPI w różnych grupach wiekowych przedstawiono w tabeli I.

Table I. Mean TF and TFPI concentrations in healthy persons in different age groups

Tabela I. Średnie stężenia TF i TFPI u osób zdrowych w różnych grupach wiekowych

Age group (year) Wiek grupy (lata)		20-30	30-40	40-50	50-60
TFPI [ng/mL]	Mean Średnia	102.25	105.36	88.89	81.18
	SD	26.1	32.3	21.46	16.04
	p	X	> 0.05	> 0.05	> 0.05
TF [ng/mL]	Mean Średnia	209.4	198.32	235.15	229.41
	SD	71.3	83.24	87.17	68.28
	p	X	> 0.05	> 0.05	> 0.05

-smokers (n = 13) or former smokers (n = 14). The mean total concentration of TFPI and activity in the group of non smokers was 91.6 ± 19.5 ng/mL and TFPI activity was 85.3 ± 6.3 ng/mL respectively, in the group of former smokers the mean concentration of total TFPI was 81.1 ± 21.2 ng/mL, TFPI activity 86.9 ± 10.9 ng/mL and in smokers group mean total concentration of TFPI was 92.9 ± 19.2 ng/mL and activity 89.4 ± 10.9 ng/mL. There were no statistically significant differences between TFPI mean concentrations and activity in all investigated groups. Cigarette smoking seems to have no effect either on TFPI concentration or on activity in healthy persons (Table II).

3. TFPI concentration in patients with PAOD and Buerger's disease

Patients with PAOD and Buerger's disease showed statistically significant elevated concentrations of TFPI compared to healthy persons without any symptoms of the arterial disease (333.3 ± 100.2 ng/mL, 177.9 ± 67.1 ng/mL and 95.7 ± 25.3 ng/mL respectively). The results are presented in Figure 1.

4. The effect of elevated plasma concentration of lipoproteins on TFPI concentration in patients suffering from PAOD in stage III

The investigation was carried on 26 patients with PAOD in stage III and 20 healthy persons in similar age. Patients were divided into two groups (n = 13 each) one with cholesterol level under 200 g/L, and the other one with cholesterol concentration above 200 g/L. All patients had elevated TFPI concentration (the mean concentration of TFPI was 333.3 ± 100.2 ng/mL) compared to control group (82.17 ± 22.64 ng/mL). There was no difference between mean TFPI levels in both

Średnie wartości APTT, PT, stężenia fibrynogenu, stężenia fragmentu protrombiny F1+2 w poszczególnych grupach nie różniły się statystycznie i nie wykazywały poza granice normy przyjęte dla osób zdrowych. Podobnie nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w parametrach gospodarki lipidowej w badanych grupach osób zdrowych. Nie stwierdzono ponadto istotnej statystycznie korelacji stężenia TFPI ze stężeniem całkowitego cholesterolu, triacylogliceroli, stężeniem cholesterolu frakcji LDL i HDL oraz sumą tych stężeń (HDL + LDL) u osób zdrowych.

2. Określenie stężenia i aktywności TFPI u osób palących tytoń

Oznaczenie stężenia i aktywności TFPI wykonano: u 26 osób palących regularnie średnio 20 papierosów/dz., u 14 osób, które paliły tytoń, a w momencie włączenia do badania nie paliły ok. 0,5–5 lat, oraz u 13 osób zdrowych, które nigdy nie paliły tytoniu. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli II. Nie wykazały one istotnych różnic w stężeniu i aktywności TFPI u osób zdrowych w zależności od palenia tytoniu.

3. Określenie stężenia TFPI u osób z PAOD i chorobą Buergera

Wykonane badania wykazały statystycznie znacznie podwyższone stężenie TFPI u osób z PAOD ($333,3 \pm 100,2$ ng/ml), a także u osób z chorobą Buergera ($177,9 \pm 67,1$ ng/ml) w porównaniu ze zdrowymi ($95,7 \pm 25,3$ ng/ml). Średnie stężenie TFPI w badanych grupach chorych przedstawiono na rycinie 1.

4. Wpływ zaburzeń gospodarki lipidowej na stężenie TFPI u chorych z PAOD w III stadium według Fontaine'a

Wyniki badań przeprowadzonych u chorych z PAOD w III stadium według Fontaine'a przedstawiono w tabeli III.

Table II. TFPI concentration and activity in smokers, non-smokers and former smokers

Tabela II. Stężenie i aktywność TFPI u osób palących regularnie tytoń, u osób, które paliły tytoń w przeszłości oraz u osób zdrowych nigdy niepalących tytoniu

		Non-smokers Niepalący	Smokers Palący	Former smokers Palący dawniej
TFPI [ng/mL]	Mean Średnia	91.6	92.9	81.1
	SD	19.5	19.2	21.2
	p	X	> 0.05	> 0.05
TFPI activity Aktywność [ng/mL]	Mean Średnia	85.3	89.4	86.9
	SD	6.3	10.9	9.9
	p	X	> 0.05	> 0.05

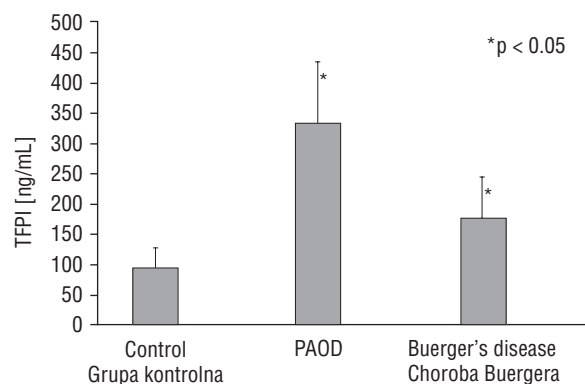


Figure 1. TFPI concentration in healthy persons, in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and in patients with Buerger's disease

Rycina 1. Stężenie TFPI u osób zdrowych, u chorych z zarostową miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAOD) oraz u osób z chorobą Buergera

Table III. TFPI concentration and some lipoproteins in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD) stage III according to Fontaine

Tabela III. Stężenie TFPI oraz wybranych parametrów gospodarki lipidowej u chorych z zarostową miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAOD) w III stadium według Fontaine'a, z podziałem na grupę chorych z hipercholesterolemią i z prawidłowym stężeniem cholesterolu

		Healthy	PAOD stage III III stadium PAOD		
		Osoby zdrowe	All Wszyscy	Cholesterol > 200 mg/L	Cholesterol < 200 mg/L
TFPI [ng/mL]	Mean Średnia	95.7	333.3	323.9	346.3
	SD	25.3	100.2	113.2	84.7
LDL [mg/L]	Mean Średnia	111	141.5	169.0	111.6
	SD	16	43.5	43.6	9.8
HDL [mg/L]	Mean Średnia	47	40.2	43.9	35.0
	SD	6	10.0	11.5	4.2
TG [mg/L]	Mean Średnia	100	142.1	158.8	119.0
	SD	17	56.0	56.7	49.2
Cholesterol total Stężenie całkowitego cholesterolu [mg/L]	Mean Średnia	175	214.1	247.7	167.8
	SD	21	50.7	38.8	15.2
APTT [s]	Mean Średnia	32.6	34.0	34.7	32.9
	SD	4.3	5.0	5.6	3.9
PT (%)	Mean Średnia	101.3	102.6	104.9	99.5
	SD	6.7	8.8	8.0	9.4
Fibrinogen [g/L]	Mean Średnia	3.88	4.61	4.32	5.49
	SD	0.68	1.33	1.40	0.67

groups of patients. However the mean concentration of LDL was significantly higher in the group with hipercholesterolaemia (169 mg/L, 111.6 mg/L respectively). There were observed no statistical significant differences between APTT, PT and fibrinogen concentrations in all investigated groups (Table III). There was also no correlation between TFPI concentration and either HDL or LDL concentrations.

5. The effect of conservative treatment of patients with PAOD with pentoxifylline or alprostadil on TF and TFPI concentrations

Intravenous infusions of pentoxifylline or alprostadil had no effect on TFPI and TF concentrations in patients with PAOD. There were also no significant differences in TFPI and TF concentrations between the groups of patients treated with different medications (Table IV).

W grupie tej stwierdzono statystycznie znamienne podwyższone stężenie TFPI w porównaniu z osobami zdrowymi. Średnie stężenia TFPI zarówno w grupie chorych z podwyższonym stężeniem cholesterolu, jak i z prawidłowym, nie różniły się istotnie, chociaż wśród chorych z hipercholesterolemią odnotowano istotnie wyższe stężenie triacylogliceroli i cholesterolu frakcji LDL. Nie stwierdzono istotnych różnic średnich czasów APTT i PT oraz stężenia fibrynogenu pomiędzy grupą osób zdrowych a grupą chorych z prawidłowymi parametrami gospodarki lipidowej, a także grupą chorych z hipercholesterolemią. Otrzymane wyniki badań sugerują, że podwyższone stężenie TFPI u chorych z PAOD odzwierciedla prawdopodobnie zaburzoną czynność śródbłonna, a nie zmiany w składzie lipoprotein osocza. W badanej grupie chorych nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem TFPI a wybranymi parametrami gospodarki lipidowej.

Table IV. The effect of conservative treatment (Prostava-
sin, Trental) on TF and TFPI concentrations in peripheral
arterial occlusive disease stage III according to Fontaine

Tabela IV. Wpływ leczenia zachowawczego (Prostava-
sin, Trental) na stężenie TF i TFPI u chorych na zarostową
miażdżycę tętnic kończyn dolnych

		Trental		Prostava- sin	
		Before Przed	After Po	Before Przed	After Po
TF [pg/mL]	Mean Średnia	217.82	225.43	221.83	233.45
	SD	72.81	64.25	80.41	73.79
TFPI [ng/mL]	Mean Średnia	263.98	290.97	233.64	242.90
	SD	52.63	146.71	48.45	78.12

Discussion

The results of our study did not show significant differences between TF and TFPI concentrations in healthy people in association with age. Elevated concentration of TFPI in elderly persons has been reported previously, however there was correlation with the inflammation-sensitive proteins, lipids and arteriosclerosis changes [10]. Patients with PAOD or Buerger's disease showed elevated concentrations of TFPI compared to healthy adults without any symptoms of the arterial disease. On the contrary, our study showed no significant differences of TF concentration in patients with PAOD.

Tissue factor dependent coagulation system, platelets and endothelial cells are involved in the initiating phase of atherosclerotic lesions. Their participation is more established in the latter phases of intraluminal evolution of thromboembolic complications and the development of atherosclerosis. During the early stages, tissue factor and activation of coagulation are present in the vessel wall and then within the lesion. This intra-cellular coagulation results in the production of thrombi in the tissues.

It may explain the lack of changes in plasma concentration of TF observed in patients with PAOD. Another explanation might be short half live time of TF and/or its rapid neutralization by its inhibitor — TFPI, which released from endothelium and circulating in blood is the strongest natural inhibitor of TF. Our study revealed increased TFPI concentration in patients with PAOD or Buerger's disease.

Deposition of TF protein in the matrix of the necrotic core of the atherosclerotic plaque may contribute to the hyperthrombotic state of human atherosclerotic vessels. Plaque disruption and exposure of subendothelial procoagulants such as TF to circulating factor VII/VIIa lead to

5. Wpływ leczenia zachowawczego na stężenie TF i TFPI u chorych na zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych

W badanej grupie chorych, którzy otrzymali dożylnie wlewy leku działającego na naczynia krwionośne (Prostava-
sin) lub zwiększającego właściwości reologiczne erytrocytów (Trental), nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeniami TF i TFPI zarówno przed, jak i po podaniu leku (tab. IV) oraz nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy grupami pacjentów otrzymujących różne leki.

Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały istotnych różnic pomiędzy stężeniem TF i TFPI u osób zdrowych w zależności od wieku. Chociaż odnotowano podwyższone stężenie TFPI u osób w podeszłym wieku, jednak korelowało ono z nasileniem zmian zapalnych i rozwojem zmian miażdżycowych [10]. Wykonane badania nie wykazały także istotnych różnic stężenia TF u chorych z PAOD, pomimo że u osób nawet bez klinicznych objawów chorób naczyń można stwierdzić zmiany miażdżycowe nasilające się wraz z wiekiem. W badaniu nie wykazano również wzrostu stężenia TF zarówno u osób w podeszłym wieku, jak i u osób z klinicznymi objawami PAOD. Przyczyną tego może być brak uwalniania do krwi TF nawet po pęknięciu blaszki miażdżycowej, wówczas jego działanie indukujące krzepnięcie krwi miałoby tylko miejscowy zasięg. Innym wytłumaczeniem braku zmian stężenia TF mógłby być krótki czas działania i jego szybka eliminacja z krążenia. Krążący we krwi i uwalniany ze śródbłonna najsilniejszy TFPI odgrywałby przy tym główną rolę w eliminacji generowanego TF.

Akumulacja czynnika tkankowego w rdzeniu blaszki miażdżycowej może przyczynić się do zwiększonej trombogeniczności zmienionych miażdżycowo naczyń. Pęknięcie blaszki i ekspozycja TF do krążącego czynnika VII może prowadzić do powstania zakrzepu [17, 18]. Makrofagi mogą być głównym źródłem TF w blaszkach miażdżycowych, a jego gromadzenie się jest jednym z pierwszych efektów migracji makrofagów do ściany naczynia. Z chwilą aktywacji komórek mięśni gładkich ściany naczynia stają się drugim źródłem TF w rozwijającej się zmianie miażdżycowej. Czynniki tkankowe uwalniane przez makrofagi i komórki mięśni gładkich gromadzi się w martwiczym rdzeniu blaszki miażdżycowej. Podczas spontanicznego pęknięcia blaszki TF uwalnia się do krążącej krwi, inicjując krzepnięcie [18, 19]. Inhibitor zewnątrzpo pochodnego układu krzepnięcia odgrywa dużą rolę w miejscowym hamowaniu czynnika tkanko-

intravascular thrombosis [17, 18]. Macrophages seem to be the main source of TF in arteriosclerotic plaques. TF accumulation is a first phenomenon reflecting migration of macrophages to the vessel wall. Activation of vascular smooth muscle cells induces the synthesis of TF in these cells becoming a second TF source in the developing atherosclerotic plaque. TF released from macrophages, smooth muscle cells is accumulated in the necrotic constituent of atherosclerotic plaque. Spontaneous plaque rupture releases TF to the circulating blood initiating coagulation cascade [18, 19].

Local production of TFPI may regulate procoagulant activity and thrombotic events within atherosclerotic plaques decreasing the thrombogenicity of the ruptured atherosclerotic plaques [20]. The exact mechanism of TFPI-dependent inhibition of TF in plaque has to be elucidated. TFPI protein and mRNA were detected in the adventitial layer of arteries, but were undetectable in the luminal endothelium. Expression of TFPI was most intense at the base of the atherosclerotic plaque. TFPI protein was found in areas of the plaque where TF was abundant and colocalized with macrophages, suggesting that these cells are responsible for TFPI synthesis [21]. Caplice et al. showed that TFPI is not present in all atherosclerotic plaques [22]. TF procoagulant activity was significantly higher in plaque where TFPI was undetected. The data suggest that biologically active TFPI is present within human atherosclerotic plaque and is associated with attenuated TF activity [22].

The typical conservative treatment of PAOD with vasoactive drug (alprostadil) or medication increasing deformability of erythrocytes (pentoxifylline) had no effect on TF and TFPI concentration in investigated group of patients. It may suggest that conservative treatment increases the efficiency of microcirculation in lower extremities, but has no significant effect on the functional state of the endothelium measured in terms of TFPI release.

Cigarette smoking is a major risk factor for development of cardiovascular diseases. Carbon monoxide and nicotine are at present considered to be the most likely mediators of vascular impairment and endothelial damage. Smoking increases also plaque TF expression and thrombogenicity [23]. However the results of our study showed similar TFPI concentrations in healthy smokers as in non-smokers.

Saito et al. reported significantly higher mean TF, total TFPI and free TFPI antigen concentrations in patients with hyperlipidaemia without clinical symptoms of vascular disease than in controls [2]. He found a statistically significant positive correlation between the level of total TFPI and total cholesterol. The study of Hansen et

wego, przyczyniając się do zmniejszenia trombogeniczności pękniętych blaszek miażdżycowych [20]. Mechanizm hamującego działania TFPI na krzepnięcie indukowane przez TF nie jest do końca poznany. W prawidłowych naczyniach tętniczych stwierdzano ekspresję białka TFPI i mRNA w przydanie naczyniowej, natomiast nie obserwowano obecności TFPI w śródbłonku. Podobnie jak w naczyniach osób zdrowych większą ekspresję TFPI obserwowano u podstawy blaszki miażdżycowej. W całej blaszce miażdżycowej stwierdzano miejsca syntezy TFPI, którego źródłem są najprawdopodobniej makrofagi migrujące do blaszek [21]. Caplice i wsp. wykazali, że nie we wszystkich blaszkach miażdżycowych jest obecny TFPI [22]. Aktywność prokoagulacyjna TF była istotnie wyższa w zmianach miażdżycowych pozbawionych TFPI. Natomiast neutralizacja TFPI w blaszkach, w których był obecny, powodowała 8-krotny wzrost aktywności TF. Inhibitor ten obecny w zmianach miażdżycowych może zatem odgrywać istotną rolę w miejscowej regulacji krzepnięcia w miażdżycy [22].

Badania dotyczące wpływu leczenia zachowawczego na stężenie TF i TFPI u chorych na miażdżycę zrostową tętnic kończyn dolnych nie wykazały oddziaływania leków naczynioruchowych, a także zmieniających właściwości reologiczne krwinek czerwonych. Leki te najprawdopodobniej poprawiają mikrokrążenie w dotkniętych chorobą kończynach, lecz nie wpływają istotnie na stan funkcjonalny zmienionego miażdżycowo śródbłonka.

Palenie tytoniu jest powszechnie uznawanym głównym czynnikiem ryzyka chorób układu krążenia. Tlenek węgla i nikotyna odpowiadają za uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego. Palenie tytoniu powoduje również wzrost ekspresji TF w blaszkach miażdżycowych, zwiększając w ten sposób ich trombogeniczność [23]. Przeprowadzone badania nie wykazały jednak wpływu palenia tytoniu na stężenie TFPI.

Saito i wsp. zaobserwowali statystycznie wyższe stężenie TF i TFPI u pacjentów z hiperlipidemią bez klinicznych objawów choroby naczyń [2]. Odnotowali również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem TFPI a stężeniem całkowitym cholesterolu. Badania Hansena i wsp. wykazały, że osoczowy TFPI korelował ze stężeniem cholesterolu frakcji LDL u osób z rodzinną cholesterolemią [24]. W przedstawionych badaniach również obserwowano podwyższone stężenie TFPI u pacjentów z PAOD, jednak nie wykazano zależności ze stężeniem cholesterolu i lipoprotein.

Uzyskane wyniki sugerują, że znane czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy (hiperlipidemia, palenie tytoniu) bezpośrednio w niewielkim stopniu wpływają na stężenie TFPI, podobnie jak leki naczynioruchowe czy po-

al. demonstrated that plasma TFPI was associated with and regulated by LDL in plasma from healthy subjects and patients with familial hypercholesterolaemia [24]. We observed elevated concentration of TFPI in our patients with PAOD however there was no significant difference between the group with hypercholesterolaemia and with normal cholesterol level. It suggests that the state of endothelium changed by atherosclerotic process in patients with PAOD may have more influence on TFPI concentration than plasma lipoprotein concentration alone.

In summary, TFPI concentration did not appear to increase with recognized atherosclerosis risk factors: age and cigarette smoking in healthy persons. Elevated TFPI concentration observed in patients suffering from PAOD or Buerger's disease may predominantly be associated with inflammation and/or probably reflects endothelial damage. The treatment of PAOD with drugs presenting little if any effect on endothelial cells (pentoxifylline, alprostadil), have no significant effect on TFPI concentration.

References

- Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Hara S, Kisanuki A, Sumiyoshi A (1998) The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 4: 135.
- Saito M, Morishita E, Asakura H, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, Yamazaki M, Aoshima K, Matsuda T (1996) Analysis of behaviors of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in patients with various diseases. *Rinsho Ketsueki*, 37: 794.
- Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Milewich JP (1988) The lipoprotein associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII/tissue factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood*, 71: 335.
- Rao LVM, Rapaport SI (1987) Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood*, 69: 645.
- Hammamoto T, Yamamoto M, Nordfang O, Peterson JGL, Foster DC, Kiesel W (1993) Inhibitory properties of full length and truncated recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *J Biol Chem*, 268: 8704.
- Broze GJ Jr, Girard TJ, Novotny WF (1990) Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*, 29: 7539.
- Ameri A, Hyers TM, Tricomi S, Kuppuswamy MN, Bajaj SP (1997) Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Blood*, 78: 107a.
- Rana SV, Reimers HJ, Pathikonda MS, Bajaj SP (1988) Expression of tissue factor and factor VIIa/tissue factor inhibitor activity in endotoxin or phorbol ester stimulated U937 monocyte like cells. *Blood*, 71: 259.
- Sandset PM, Larsen ML, Abildgaard U (1991) Chromogenic substrate assay of extrinsic pathway inhibitor (EPI): levels in the normal population and relation to cholesterol. *Blood Coagul Fibrinol*, 2: 425.
- Sakkinen PA, Cushman M, Psaty BM, Kuller LH, Bajaj SP, Sabharwal AK, Boineau R, Macy E, Tracy RP (1998) Correlates of antithrombin, protein C, protein S, and TFPI in a healthy elderly cohort. *Thromb Haemost*, 80: 134.
- Creasey AA, Chang ACK, Feigen L, Wun TC, Taylor FB Jr, Hinshaw LB (1993) Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest*, 91: 2850.
- Day KC, Hoffman LC, Palmier MO, Kretzmer KK, Huang MD, Pyla EY, Spokas E, Broze GJ Jr, Warren TG, Wun TC (1990) Recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor inhibits tissue thromboplastin-induced intravascular coagulation in the rabbit. *Blood*, 76: 1538.
- Haskel EJ, Torr SR, Day KC, Palmier MO, Wun TC, Sobel BE, Abenschein DR (1991) Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with recombinant lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Circulation*, 84: 821.
- von Claus A (1957) Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol*, 17: 237.
- Finley PR, Schiffman RB, Williams RJ, Licht DA (1978) Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg^{2+} /dextran sulfate in its enzymic measurement. *Clin Chem*, 24: 931.
- Warnick GR, Mayfield C, Benderson J, Chen JS, Albers JJ (1982) HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate- Mg^{2+} and by dextran sulfate- Mn^{2+} -polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method. *Am J Clin Pathol*, 78: 718.
- Prydz H (1992) The tissue factor pathway and cardiovascular disease. In: *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis and endothelial function: Fundamental and clinical cardiology*. Vol. 8, ed. R.B.Jr. Francis. Marcel Dekker Inc., New York, 35.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwarz SM, Gordon D (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2839.
- Taubman MB, Fallon JT, Schecter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y (1997) Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 78: 200.
- Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human

- atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 99: 1780.
21. Drew AF, Davenport P, Apostolopoulos J (1997) Tipping PG (Tissue factor pathway inhibitor expression in atherosclerosis. *Lab Invest* 77: 291.
 22. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Simari RD (1998) Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*, 98: 1051.
 23. Matetzky S, Tani S, Kangavari S, Dimayuga P, Yano J, Xu H, Chyu K, Fishbein M, Shah PK, Cercek B (2000) Smoking Increases Tissue Factor Expression in Atherosclerotic Plaques: Implications for Plaque Thrombogenicity. *Circulation*, 102: 602.
 24. Hansen JB, Huseby KR, Sandset PM, Svensson B, Lygmo V, Nordoy A (1994) Tissue factor pathway inhibitor and lipoproteins: evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. *Arterioscler Thromb*, 14: 223.
 25. Radziwon P, Schenk J, Boczkowska-Radziwon B, Fareed J, Breddin HK (1996) TFPI release by GAGs and its role in their mechanism of action. In: *Nonanticoagulant actions of glycosaminoglycans*. (ed.) J. Harenberg, B. Casu. Plenum Press, New York and London 227.
 26. Rapaport SI, Rao LVM (1995) The tissue factor pathway: How it has become a "Prima Ballerina". *Thromb Haemost*, 4: 7.
 27. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML (1988) Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res*, 50: 803.